Ueber

die physiologischen Bedingungen der endogenen Sporenbildung

bei Bacillus anthracis, subtilis und tumescens.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Oswald Schreiber,

approb. Tierarzt aus Friedrichsgrün, Königreich Sachsen.

Jena

Gustav Fischer

1896.

Ueber

die physiologischen Bedingungen der endogenen Sporenbildung

bei Bacillus anthracis, subtilis und tumescens.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Oswald Schreiber,

approb. Tierarzt aus Friedrichsgrün, Königreich Sachsen.

Jena

Gustav Fischer

1896.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548622_0028

Meinen teueren Eltern

als Zeichen innigster Dankbarkeit

gewidmet.

Allgemeiner Teil.

Einleitung.

Außer der Vermehrung durch Teilung ist vielen Spaltpilzen, vornehmlich den Stäbchenbakterien, auch eine Fortpflanzung durch Sporenbildung eigen. Dieselbe tritt in zwei Formen auf, aus welchem Grunde man nach de Bary (84) endospore und arthrospore Bakterien unterscheidet.

In der hier folgenden Arbeit handelt es sich allein um die endogene Sporenbildung. Dieser Vorgang beruht auf einer Verdichtung und entweder mehr centralen oder mehr endständigen Kontraktion des Bakterienprotoplasmas. Hierbei rundet sich die entstehende Masse ab oder wird oval, eiförmig und umgiebt sich mit einer glatten, farblosen, dunkelkonturierten Membran. Der Inhalt dieses als Spore bezeichneten Gebildes ist außerordentlich stark lichtbrechend. Später wird dieselbe durch den Zerfall der Mutterzelle frei. Kam die Sporenbildung an der Oberfläche von Flüssigkeiten in einer Haut zu stande, dann sinken die Sporen als weißes Pulver zu Boden (Brefeld 81). Durch besondere Widerstandsfähigkeit gegen schädliche Einflüsse ausgezeichnet, werden die Sporen so zu einer Dauerform, welche der Erhaltung der Art dient. Jede Bakterienzelle bildet in ihrem Innern nur eine Spore, welche die Fähigkeit besitzt, unter günstigen Verhältnissen sofort oder nach einer Ruhepause wieder zur vegetativen Form auszukeimen.

Von jeher hat man dieser Art der Vermehrung ein besonderes Interesse gewidmet, und, aus praktischen Gründen geleitet, die Bedingungen für das Zustandekommen jener Dauerformen zu ergründen gestrebt. Bis jetzt freilich ist man noch zu keinem befriedigenden Abschlusse und keiner Einigkeit gelangt.

Ueber die Ursache der Sporenbildung bei den Spaltpilzen herrschen augenblicklich verschiedene Ansichten, für welche ihre Anhänger bestrebt sind, Beweismaterial zu erbringen. Eine von C. Fraenkel (91, p. 23) vertretene Annahme sucht die Sporenbildung auf der Höhe der Entwickelung, wenn sich die Bakterien unter den besten Ernährungs- und Wachstumsbedingungen befinden, in inneren, nicht er-

gründbaren Ursachen. Zu demselben Resultate sind auch Behring (89), Lehmann (90) und Osborne (90) auf Grund ihrer Untersuchungen gelangt. Eine andere, hauptsächlich von H. Buchner (82, p. 141) verfochtene Anschauung sucht die Ursache der Sporenbildung in dem eintretenden Mangel an Ernährungsmaterial. Dieser Meinung neigen auch Brefeld (81), Soyka (86), Roux (90) und Rodet (95) in ihren Arbeiten zu. Turrò (91), welcher zwar eine Erschöpfung des Nährbodens leugnet, kommt dennoch mit seinen Beobachtungen beim Milzbrandbacillus der letzteren Ansicht sehr nahe. Nach diesem Autor ist die Sporenbildung das Endergebnis der Einwirkung des Luftsauerstoffes mit den erzeugten Stoffwechselprodukten.

Keine der ausgesprochenen Ansichten über die Ursachen der Sporenbildung hat sich allgemeine Anerkennung errungen, weil das thatsächliche Material an Beobachtungen zu wenig beweiskräftig ist.

Auf Anraten und mit der gütigen Unterstützung des Herrn Prof. Dr. Klebs, welcher besonders für die Algen überaus wichtige und bahnbrechende Erforschungen auf dem Gebiete der Fortpflanzungsphysiologie gemacht hat, habe ich es unternommen, Studien über diesen Punkt bei einigen endosporen Bakterien anzustellen. Daraufhin wurden die folgenden Versuche und diese Arbeit im pflanzenphysiologischen Institut der Universität Basel ausgeführt. Es sei mir auch an dieser Stelle gestattet, Herrn Prof. Dr. Klebs sowohl für die Ueberlassung der Arbeit, als besonders für die wertvollen Ratschläge meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen. Weiterhin sage ich Herrn Prof. Dr. Roth und Herrn Prof. Dr. Dubler für die liebenswürdige Ueberlassung des Milzbrandmaterials, sowie Einräumung eines Arbeitsraumes im pathologischen Institute während der Osterferien 1896 meinen ergebensten Dank.

Da der Milzbrandbacillus einen unserer bestgekanntesten Spaltpilze repräsentiert, andererseits aber auch die Kenntnis von den Ursachen seiner Sporenbildung großes hygienisches Interesse bietet, so sind fast ausschließlich die bis jetzt gemachten Untersuchungen zur Klärung dieser Ursache an jenem Spaltpilze angestellt worden. Auch ich habe ihn meinem Studium zu Grunde gelegt und alle Beobachtungen an ihm geprüft, die ich durch die Versuche mit dem Bacillus subtilis und Bacillus tumescens (Zopf 85) gewonnen habe.

Allgemeine morphologische und physiologische Vorbemerkungen.

Die Morphologie des Bacillus anthracis, subtilis und tumescens darf in den Grundzügen als bekannt betrachtet werden. Auch die Physiologie ist bei den ersten beiden Bakterien genau untersucht worden, während über diejenige des Bacillus tumescens nur wenige Angaben und zwar von A. Koch (88) existieren, da es bis jetzt noch nicht gelang, denselben in flüssigen Substraten zu ergiebigem Wachstume zu bringen.

Zunächst will ich die Morphologie und Physiologie, welche bei den drei zu behandelnden Spaltpilzen in vielen Stücken ähnelt oder

übereinstimmt, nur soweit anführen, als dieselben für meine Untersuchungen in Betracht kommen. Da ich aber infolge der vielseitigen Züchtungsversuche in den Entwickelungsgang einen tieferen Einblick gewonnen habe und auf einige Punkte ein besonderes Augenmerk gerichtet, so werde ich jene Beobachtungen gleich bei dieser Gelegenheit mitteilen. Was die Physiologie der Sporenbildung anbelangt, so wird dieselbe, sofern sie bis jetzt bekannt ist, im Anschluß hieran für alle drei Bakterien gemeinsam besprochen werden.

Bacillus anthracis.

Der Bacillus anthracis, ein fakultativer Parasit, stellt in seiner vegetativen Form unbewegliche, glashelle, homogene Stäbchen mit abgestutzten Enden dar. Bei einem Querdurchmesser von 1,0—1,5 μ beträgt seine Länge nur 1,5—2,0 μ. Man trifft ihn jedoch wohl kaum in Form dieser Kurzstäbchen an, sondern stets in Verbänden von 2—5 Gliedern, welche dann eine einzige Bakterienzelle vortäuschen. Während sich der Bacillus innerhalb des lebenden tierischen Organismus niemals anders uns darbietet, wächst er außerhalb desselben zu langen Fäden, die dann gebogen und strickartig gewunden verlaufen, aus. Nach einiger Zeit treten auf künstlichen Nährböden im Innern dieser Fäden in regelmäßigen Zwischenräumen ovale, stark lichtbrechende Sporen auf, welche die Dauerform des Bacillus darstellen. Diese Sporen haben die Fähigkeit, unter günstigen Bedingungen sofort und zwar auch in derselben Nährflüssigkeit (Koch 76, p. 289) wieder auszukeimen, wobei sie ihren starken Glanz verlieren, langgezogen werden und endlich zu neuen Stäbchen und Fäden auswachsen.

Da es nun einerseits sehr merkwürdig ist, warum der Milzbrandbacillus gerade nur innerhalb des Körpers in kurzen Stäbchen auftritt, andererseits aber diese Erscheinung bisher weder aufgeklärt, noch experimentell nachzumachen gelang, so strebte ich besonders danach, möglichst kurze Stäbchen bei meinen Züchtungsversuchen zu erlangen.

Veranlaßt durch die Angabe de Bary's (84), daß in Peptonlösungen manchmal ein Zerfall der Milzbrandbacillen zu beobachten sei, habe ich diesen Umstand als Angriffspunkt benutzt. Ferner machte ich die Beobachtung, daß Kochsalz- und Sodalösungen, sowie bei Züchtung unter Luftabschluß ebenfalls kürzere Glieder auftreten. Durch Kombination dieser Faktoren nun ist es mir gelungen, auch relativ kurze Stäbchen zu erhalten. In einer Nährlösung, bestehend aus 20 Proz. Pepton, 0,2 Proz. Kalium phosphoricum, 0,1 Proz. Magnesium sulfuricum mit je 1,0 Proz. Natrium chloratum und Natrium carbonicum, habe ich, wenn auch neben längeren Fäden, die jedoch niemals spiralig gewunden waren, in luftdicht verschlossenen und vollständig gefüllten Reagensröhrchen stets reichlich Glieder von 7,0—20,0 μ bekommen und beliebig lange fortzüchten und erhalten können.

Nach den bisherigen Untersuchungen gilt der Bacillus anthracis als ein streng aërober Organismus, welcher nur bei ungehindertem Zutritt des Luftsauerstoffes zu ergiebigem Wachstume

und zur Sporenbildung gelangt. Außer diesem hat er aber auch noch einen gewissen Grad von Feuchtigkeit und einen bestimmten Temperaturkreis notwendig (Koch 76, Soyka 86). Ueber die Temperaturgrenzen hat R. Koch (76) genaue Angaben gemacht. Nach genanntem Autor ist für den Milzbrandbacillus das Temperaturoptimum bei 35° C zu suchen. Das Minimum liegt bei 12°, bei 40° C wird das Wachstum kümmerlich und 45° sind das Temperaturmaximum.

Von besonderem Interesse sind die verschiedenen Nährsubstrate, welche wegen der hervorragenden pathologischen Bedeutung des Bacillus eingehend untersucht sind. In erster Linie ist die Reaktion der Nährböden von Wichtigkeit. Dieselbe soll neutral oder schwach alkalisch sein, nach Buchner's (82) Angaben bleibt bereits auf schwach sauren Substraten das Wachstum aus.

Auf folgenden, natürlich vorkommenden Nährmedien ist eine Vegetation des Milzbrandbacillus beobachtet worden. Nach R. Koch (81) gedeiht er auf neutralen oder schwach alkalischen Aufgüssen des Heues und einzelner Grassorten, auf Erbsenstrohwasser, frischem Saft von rohen Kartoffeln und den verschiedenen Rübenarten. Ferner wächst er ausgezeichnet auf Gemengen stärkemehlhaltiger, zerquetschter Samen mit Wasser, besonders Blutserum, neutralem oder alkalischem Menschenharn (Kitt 85). Nicht gelang es demselben Autor, ihn auf alkalischem Rinder-, Schaf- oder Pferdeharn zu züchten, was Pettenkofer auf die Abwesenheit phosphorsaurer Salze zurückführt. Die puren Erdsorten, wie Lehm, liefern keinen genügenden Nährboden, wohl aber im Verein mit Blut und Harn (Schrakamp 84). Ein guter Nährboden ist auch nach Kitt (85) der mit Blut besudelte alkalische Rinderkot.

Das Wachstum auf künstlichen Nährmedien dient hauptsächlich zu diagnostischen Zwecken und ist besonders auf Nährgelatine und Blutserum, welche beide eine langsame Verflüssigung erleiden, sowie Nähragar und Kartoffeln studiert worden. Näheres hierüber findet sich in jedem Lehrbuche der Bakteriologie angegeben. In flüssigen Nährsubstraten vegetiert der Pilz als zarte, weiße Wolke am Boden, ohne eine Trübung zu verursachen, auf festen, wie Agar und Kartoffeln, bildet er einen grauweißen, mattglänzenden Belag.

Was die Nährstoffe anlangt, so scheinen nach Buchner (82) nur Eiweiß und Pepton zu taugen, während die einfacheren Verbindungen, wie Leucin, Asparagin und weinsaures Ammoniak, selbst mit Zusatz von Traubenzucker, ihm unzuträglich sind.

Die Milzbrandbacillen sind sehr wenig widerstandsfähig, schon nach kurzer Einwirkung von Temperaturen über 45° C, sowie durch Austrocknen, Fäulnis und sauren Magensaft gehen sie rasch zu Grunde. Ihnen gegenüber sind die Sporen außerordentlich resistent und nur wenige Desinfektionsmittel sind befähigt, dieselben abzutöten.

Unter ungünstigen Verhältnissen machen sich an den Milzbrandbacillen Involutionsformen geltend, über welche Buchner (82, p. 219) genauere Angaben gemacht hat. Nach diesem Autor erhält man sie am sichersten in Nährlösungen, deren Zuckergehalt im Verhältnis zu den N-haltigen Nahrungsstoffen zu groß ist, ferner wenn die Sporenbildung durch schwach sauere Reaktion oder ungenügende Sauerstoff-

zufuhr verhindert wird. Auch durch Schwankungen in der Temperatur, wie das Versetzen von Kulturen aus 36° C in Zimmertemperatur, werden Involutionsformen erzeugt. Ueberhaupt übt die Ernährung, wie Buchner (82) ebenfalls am nachfolgenden Heubacillus gezeigt hat, einen großen Einfluß sowohl auf das Wachstum und die Formengestaltung, als auch, wie sich an meinen Versuchen ersehen läßt, auf die Sporenbildung der Bacillen aus. Auf alle diese Momente habe ich bei der Feststellung der Einwirkungen der einzelnen Nährstoffe besonders geachtet, und die am Schlusse angefügten Tabellen geben in die dadurch bedingten Abweichungen einen Einblick.

Bacillus subtilis.

Der Bacillus subtilis repräsentiert ein in der Natur außerordentlich verbreitetes, indifferentes Bakterium. In seiner vegetativen Form stellt dasselbe 0,5—1,2 μ breite, 2—3mal so lange, cylindrische Stäbchen mit abgerundeten Enden und homogenem, matt glänzendem Inhalte dar. Seine Dauerformen sind 0,6 μ breite, 1,2 μ lange, hellglänzende, ovale Sporen (Brefeld 81). Im Gegensatz zum Milzbrandbacillus findet die Auskeimung der Sporen äquatorial statt und kann, wie bei jenem, in geeigneten Nährmedien sofort geschehen. In Flüssigkeiten treten die jungen Bacillen fast immer in einen sehr lebhaften Schwärmzustand ein, während welches sie durch den Besitz von Geißeln ausgezeichnet sind (Koch 76, Brefeld 81, Fischer 95). Nach Brefeld (81) ist die Beweglichkeit um so lebhafter, je weniger zusagend der Nährboden ist. Gegen Ende des Schwärmzustandes sammeln sich die Bacillen auf der Oberfläche der Flüssigkeit an und wachsen meist dann zu langen Fäden aus. Durch Ausscheidung einer schleimigen Zoogloeamasse verbinden sich nun die einzelnen Glieder oder Fäden zu einer trockenen, mehr oder weniger weißen, wie bestaubt aussehenden, verschieden dicken und oft gefalteten Haut. Ueber kurz oder lang folgt dann hierauf die Sporenbildung.

In seinen Beiträgen zur Morphologie der Spaltpilze veröffentlicht Buchner (82) die Befunde über den Einfluß verschiedener Nährsubstanzen auf die Formgestaltung, welche sich bei seinen Untersuchungen über die Heu- und Milzbrandbacillen ergeben haben. Auch ich habe bei der Prüfung der Nährsubstanzen auf die Sporenbildung der Formengestaltung besondere Beachtung gewidmet, und wie ich beim Milzbrandbacillus bestrebt war, möglichst kurze Glieder zu erhalten, suchte ich umgekehrt beim Heubacillus ein Verfahren, stets lange Fäden zu bekommen. In einer Nährlösung, bestehend aus 1 Proz. Liebig's Fleischextrakt mit je 1 Proz. Pepton und Traubenzucker traten immer außerordentlich, 50,0 μ und darüber, lange Fäden auf. Fischer (95, p. 33), welcher in seinen Untersuchungen über Plasmolyse und Geißelbewegung bei den Bakterien die Angaben Buchner's bestätigt, sagt: daß besonders bei guter Ernährung und schnell aufeinander folgenden Teilungen die einzelnen Zellen sehr kurz, wenig länger als breit, bleiben. Auf Grund meiner Untersuchungen komme ich zu der Ueberzeugung, daß der Bacillus in gut nährenden Medien, aber bei Gegenwart Wachstum verzögernder Substanzen, wie

z. B. Zucker, zu langen Fäden auswächst. Während bei guter Ernährung und rapidem Wachstume kurze und breite Stäbchen auftreten, sind dieselben in schlecht nährenden Medien kurz und dünn. Ueber die Beweglichkeit und den Besitz von Geißeln hat Fischer (95) ausführliche Untersuchungen angestellt. Bei meinen Züchtungsversuchen unter Luftabschluß habe ich den Heubacillus niemals in Bewegung angetroffen, ohne aber, im Gegensatze zu Buchner (82), Involutionsformen und den Tod eintreten zu sehen. Ich habe viele Generationen in dieser Weise fortgezüchtet und fand, daß für ein bloßes Wachstum ungehinderte Sauerstoffzufuhr weder für den Bacillus subtilis, noch für den Milzbrandbacillus und den nachfolgenden Bacillus tumescens unbedingt notwendig ist.

Der Heubacillus ist bedeutend anspruchsloser als der Milzbrandbacillus. Ueberall, wo sich in der Natur organische Substanzen, Feuchtigkeit und atmosphärischer Sauerstoff darbieten, ist er zu finden (Brefeld 81). Auf künstlichen Nährböden läßt sich der Heubacillus sehr leicht züchten, vorausgesetzt, daß dieselben nicht allzu sauer reagieren.

Ueber den Einfluß der Temperaturen haben namentlich F. Cohn (76) und Brefeld (81) Versuche angestellt. Nach Brefeld liegt das Temperaturoptimum bei 24° R, hier kann sich der Kreislauf der Entwickelung schon nach 24—30 Stunden vollziehen; während unter 5° R das Wachstum nur sehr langsam und spärlich ist. Als Temperaturmaximum hat F. Cohn 50° C gefunden.

Von allen bekannten Dauerformen aber zeichnen sich die Sporen dieses Bacillus durch eine besondere Widerstandsfähigkeit sowohl gegen Hitze, sie ertragen nach Brefeld (81) noch 5 Minuten lang eine Temperatur von 110° R, wie gegen chemische Gifte, aus.

Der Einfluß der einzelnen Nährstoffe auf das Gedeihen des Bacillus subtilis haben Buchner (82) und Fischer (95) behandelt. Nach Buchner (82, p. 143) begünstigt Zuckerzusatz das Wachstum erheblich, doch sind Eiweiß und peptonartige Substanzen am geeignetsten, weniger Asparagin, Leucin und weinsaures Ammoniak selbst bei Zuckerzusatz. Zum Unterschied vom Milzbrandbacillus vermag er allerdings auch diese einfacheren Verbindungen zu verarbeiten. Bei meinen Versuchen haben sich diese Angaben vollständig bestätigt, wie sich im zweiten Teile dieser Arbeit ergeben wird und aus der Tabelle am Schlusse ersehen läßt. Als Grenze für die Entwickelung giebt Fischer (95, p. 67) für das Kochsalz 12 Proz. und für Kalisalpeter 21 Proz. an. Auch ich habe diese Salze bei meinen Versuchen verwendet und in 1-proz. Liebig's Fleischextrakt, in 1-proz. Pepton mit Nährsalzen, sowie in den gleichen Versuchen wie Fischer geprüft. Als oberste Grenze habe ich für Chlornatrium nur 7 Proz., für Kalium nitricum nur 12 Proz. gefunden, ohne daß es mir möglich war, den Grund dieses gewaltigen Unterschiedes zu finden.

Bacillus tumescens.

Der dritte in Betracht kommende endospore Spaltpilz ist der auf gekochten Wurzeln von Daucus gefundene und von Zopf (85) zuerst

beschriebene Bacillus tumescens. Seine weiteren morphologischen wie entwickelungsgeschichtlichen Eigenschaften hat A. Koch (88) untersucht. Trotzdem der Bacillus tumescens sowohl morphologisch wie biologisch dem Bacillus Megaterium (de Bary 84) außerordentlich ähnlich und von ihm schwer zu unterscheiden ist, stellen beide doch nach A. Koch (88) differente Spaltpilze dar.

Die vegetative Form des Bacillus tumescens repräsentiert sich uns je nach dem Alter als 1,17—2,1 μ breite, an den Enden abgerundete Stäbchen. Dieselben können ebenfells zu längeren Fäden auswachsen, doch wird auch die Länge (1,26 μ) von der Breite übertroffen. Die Bewegungserscheinungen, welche der Bacillus zeigt, sind im Gegensatz zum Bacillus subtilis weniger fortschreitend als um die Längsachse rotierend. Das Protoplasma ist anfangs homogen, nimmt aber mit dem Alter und kurz vor der Sporenbildung ein körniges Aussehen an. Die Dauerformen stellen ovale, stark glänzende Sporen dar, die wie diejenigen des Heubacillus in äquatorialer Richtung auskeimen.

Ueber die Physiologie des Bacillus tumescens ist wenig bekannt, nur A. Koch (88) berichtet einiges darüber. Ein besonders üppiges Wachstum zeigt er auf festen Substraten; auf gekochten Daucuswurzeln oder Kartoffeln überzieht er in kurzer Zeit als ziemlich dicke, weiße Schicht die ganze Schnittfläche. Weiter hat ihn A. Koch auf Gelatineplatten in 1-proz. Fleischextraktlösungen mit 10 Proz. Traubenzucker gezüchtet, wobei er die Gelatine gleich dem Heubacillus energisch verflüssigte. Auch dieser Spaltpilz gehört zu den aërobiontischen Bakterien.

Bei meinen Züchtungsversuchen strebte ich für den Bacillus tumescens eine Nährflüssigkeit zu finden, welche ihm ein ergiebiges Wachstum gestattet und worin lange Fäden auftreten. Diesen Anforderungen entspricht eine 1-proz. Liebig's Fleischextraktlösung mit 1-proz. Peptonzusatz.

Innerhalb der ersten 12 Stunden bei 30° C trübt sich die Flüssigkeit und enthält im Innern massenhaft schwerfällig rotierende, 1,5—2,0 μ breite, 2,4—7,0 μ lange Bacillen. Nach 20 Stunden sammeln sich dieselben an der Oberfläche an und wachsen zu langen Fäden aus, die das ganze Gesichtsfeld einnehmen und wobei die Bewegung aufhört. Nach 24 Stunden tritt in jeder auf diese Weise bereiteten Nährlösung eine vollständige, grauweiße bis ganz weiße, glatte Haut auf. Dieselbe ist vollkommen eben und fettig glänzend, es hat den Anschein, als sei die Flüssigkeit mit einer Stearinschicht überzogen. Die beschriebene Haut ist etwa 1 mm dick und starr, bei nur leichter Bewegung oder Berührung bricht sie entzwei und sinkt allmählich stückweise zu Boden. Läßt man die Haut ganz, so haben sich in ihr nach 48 Stunden große Sporen gebildet, welche in der unverletzten Haut lange die Flüssigkeitsoberfläche bedeckt halten. Erst durch Schütteln zerbricht die Haut, und dann senken sich die Teilstücke zu Boden. Wird dieselbe aber vor der Sporenbildung zum Sinken gebracht, dann bilden sich im Innern der Flüssigkeit nur vereinzelt Sporen, die Bacillen lösen sich vielmehr zu kurzen Stäbchen auf, welche allmählich körnig zerfallen.

Physiologie der Sporenbildung.

Die Physiologie der Sporenbildung behandelt hauptsächlich die Frage nach den Bedingungen, welche dieselbe verursachen.

Im Folgenden will ich nun alles Bekannte über die Sporenbildung beim Bacillus anthracis, subtilis und tumescens aufführen. Voraus bemerke ich jedoch, daß A. Koch (88) über den letztgenannten Spaltpilz sagt: daß die Sporenbildung in derselben Weise vor sich geht, wie de Bary (84) über den Bacillus Megaterium angiebt. Was aber hierüber bei diesem Autor zu finden ist, sind nur histologische und morphologische Thatsachen, die eigentliche Physiologie der Sporenbildung ist auch beim Bacillus Megaterium nicht erforscht.

Als allgemeine Erfordernisse zur Sporenbildung für jene Bakterien werden, wie für die meisten Spaltpilze überhaupt, Feuchtigkeit, ein bestimmter Temperaturkreis, ungehinderter Luftsauerstoff, sowie eine geeignete Reaktion des Nährbodens von allen Forschern angegeben, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben.

Zuerst sei der Einfluß der Temperatur auf die Sporenbildung erwähnt. Während bei dem Temperaturoptimum (35° C, R. Koch 76) vom Milzbrandbacillus schon nach 20 Stunden Sporen gebildet werden, bedarf es bei 16° C eines Zeitraumes von 7 Tagen und unter 15° C hört sowohl Wachstum wie Sporenbildung auf. Baumgarten (90, II, p. 431) giebt als geeignetste Temperatur zur Sporenbildung 30° C an, über 34° C soll nach ihm dieselbe auch unter den günstigsten Bedingungen, wenn schon nicht ausnahmslos, ausbleiben.

Für den Bacillus subtilis fand Brefeld (81), daß unter 5° R wohl noch ein langsames Wachstum, niemals aber Sporenbildung eintrete. Als oberste Grenze hat F. Cohn (76) 50° C bestimmt, wo alle Vermehrung und Sporenbildung aufhört, bei 47° C dagegen findet noch beides statt.

Als zweites Moment gehört zum Zustandekommen der Sporenbildung ungehinderter Luftzutritt, ein Faktor, welcher für den Milzbrandbacillus schon von R. Koch (76) und für den Heubacillus von F. Cohn (76) hervorgehoben wird. Brefeld (81) sagt über den Bacillus subtilis aus, daß die Sporenbildung langsamer erfolgt, wenn die Stäbchen im Innern der Flüssigkeit vegetieren, als wenn sie in Form einer Decke direkt mit der Luft in Berührung kommen. Trotzdem Buchner (90, p. 5) die günstige Einwirkung des Sauerstoffes erfahren hat, so schreibt er demselben doch keine spezifische Bedeutung für die Sporenbildung zu, sondern nur neben erhöhter Temperatur und Feuchtigkeit eine fördernde Wirkung auf das Wachstum. Die Reaktion des Nährbodens soll namentlich für den Milzbrandbacillus nicht sauer sein, nach Buchner (82) tritt wohl bei schwach saurer Reaktion noch Wachstum, wenn auch mit Involutionsformen, nicht aber Sporenbildung auf.

Außer diesen allgemeinen Anforderungen sind aber auch noch spezielle Momente gefunden worden, welche das Zustandekommen der Sporenbildung befördern oder hemmen sollen. Ich erwähne zuerst die Beobachtungen Buchner's (90), welcher sich eingehend mit der

Ursache der Sporenbildung beim Milzbrandbacillus beschäftigt hat, und auf Grund deren er dieselbe in einer Erschöpfung des Nährbodens gefunden zu haben glaubt. Er sagt: die Entwickelung der Sporen bei Milzbrand- und Heubakterien findet ganz genau in gleicher Weise statt; dieselbe wird außerdem bei beiden Pilzformen durch die gleichen Bedingungen begünstigt oder verhindert. Die physiologische Ursache der Sporenbildung aber liegt in eingetretenem Mangel an Ernährungsmaterial. Wird regelmäßig für Erneuerung der Nährlösung gesorgt, dann kann man ungezählte Generationen nur vegetativer Zustände erhalten, versäumt man dieselbe aber nur ein einziges Mal, dann kommt es bei sonst günstigen Bedingungen unfehlbar zur Sporenbildung. Das Aufbrauchen der Nahrungsstoffe aber ist nur lokal für die betreffenden vegetativen Zellen zu verstehen, es braucht nicht der ganze Nährboden erschöpft zu sein, und die Sporenbildung erfolgt um so rascher und reichlicher, je besser vorher die Ernährung und das vegetative Wachstum war. Buchner (90, p. 5) infolgedessen sucht den Grund, weshalb im Innern des Tierkörpers, auch nach dem Tode, Sporen nicht zur Entwickelung kommen, nicht nur im Mangel an Sauerstoff, sondern vornehmlich darin, daß ein Aufbrauchen der reichlich vorhandenen Nahrungsstoffe hier nicht möglich erscheint. Endlich hat er aber auch noch direkt die Sporenbildung befördernden Stoffe in Gestalt des destillierten Wassers und des Zusatzes von 2 Proz. Kochsalz zur Nährlösung gefunden. Nach der Meinung dieses Autors können durch sie nicht alle Nahrungsstoffe aus der Lösung aufgebraucht werden. Zu demselben Resultate, daß innerhalb des lebenden Körpers eine Erschöpfung an Nährstoffen durch Bakterien niemals stattfinden kann, selbst wenn sie außerordentlich virulent sind und sich stark vermehren, kommt Bitter (88) durch seine Studien am Milzbrand, Schweinerotlauf und Hühnercholera.

Weitere Mitteilungen über die Sporenbildung macht für den Bacillus anthracis und subtilis Soyka (86), nach ihm erfolgt dieselbe unter Mitwirkung des Bodens viel rascher als ohne Beteiligung desselben. Ferner wirkt günstig auf dieselbe ein bestimmter Feuchtigkeitsgrad und ein gewisses Verhältnis zwischen Boden und Feuchtigkeit. Daß auch eine Erschöpfung des Nährmediums mitspielen soll, nehmen Brefeld (81) und Soyka (86) für den Heubacillus an.

Osborne (90), welcher Buchner's Annahme von der Erschöpfung prüfte, kommt auf Grund seiner Versuche zu der Ueberzeugung, daß der erschöpfte Nährboden keinen begünstigenden Einfluß auf die Sporenbildung des Milzbrandbacillus haben kann, dieselbe vielmehr überall auf besseren Nährböden nicht nur absolut, sondern auch relativ reichlicher eintritt. Ebenso verzögert eine Verdünnung der Nährlösung die Sporenbildung, was auch Brefeld (81) für den Heubacillus gefunden hat. Wie Buchner (82) für den Milzbrandbacillus und Brefeld (81) für den Heubacillus nachgewiesen haben, ist die Sporenbildung nicht an eine bestimmte Entwickelungsform geknüpft, dieselbe kann sowohl in den kürzesten, noch in Bewegung befindlichen Stäbchen als in den längsten Fäden vor sich gehen.

Turrò (91), welcher von der Annahme ausging, daß die Sporenbildung durch Schädigung des Nährbodens vermittelst der eigenen Stoffwechselprodukte bedingt werde, experimentierte mit durch Milzbrandwachstum erschöpftem Nähragar bei Gegenwart von Luftsauerstoff. Bei seinen Versuchen sah er nur dann wieder ein neues Wachstum, und zwar in der gewöhnlichen Weise, eintreten, wenn der Nährboden vorher durch Sodalösung neutralisiert war. Wurde jedoch das erschöpfte Material mit destilliertem Wasser (1 : 4) verdünnt, so war das Wachstum merklich beschleunigt. Auf Grund seiner Beobachtungen schließt Turrò, daß Luftsauerstoff und Stoffwechselprodukte die Kohlenwasserstoffverbindungen des Zellprotoplasmas verbrennen, während die Stickstoffverbindungen, welche den Hauptbestandteil der Sporen ausmachen, übrig bleiben und als Endergebnis die Bildung der Sporen bedingen.

Endlich sei erwähnt, daß auch ein Ausbleiben der Sporenbildung beobachtet wurde und zwar eine vorübergehende Hemmung beim Heubacillus durch Brefeld (81) überall dort, wo andere Bakterienkeime verunreinigend auftreten. Dauernden asporogenen Milzbrand zu erzeugen gelang Behring, Lehmann, Heim, Buchner, Roux, derselbe vermochte sich nicht mehr in sporogenen umzuwandeln. Am sichersten erhält man ihn durch Zusatz von Desinficentien in ganz schwacher Konzentration zur Nährlösung (1 : 1000 Karbolsäure, 2 : 20—10000 Phenol). Phisalix (92), welcher durch systematische Fortzüchtung bei 42° C einen vererblichen asporogenen Milzbrand erhielt, vermochte demselben umgekehrt aber wiederum auch die volle Fähigkeit der Sporenbildung zu verschaffen.

Behring (89) kommt nach der Prüfung der Bedingungen, welche die Sporenbildung beeinflussen, zu der Ansicht, daß das Ausbleiben derselben der Ausdruck ist für eine partielle Schädigung der physiologischen bezw. morphologischen Eigenschaften des Milzbrandes, und daß dieselbe durch die verschiedensten Mittel erreicht werden kann.

Prüfen wir, was bis jetzt zur Aufklärung der Frage nach der Ursache der Sporenbildung gefunden worden ist und für welche Anschauung die größte Wahrscheinlichkeit spricht, so finden wir, daß bis jetzt noch keine klare Antwort möglich ist, vielmehr sich die meisten Angaben zu widersprechen scheinen. In dem einen Punkte aber kommen sowohl Fraenkel (91, p. 23) und Buchner (90, p. 2) als auch die übrigen Forscher überein, daß die Sporenbildung überall dort um so schneller und vollkommener eintritt, wo das Wachstum am reichlichsten und üppigsten vorher stattfindet.

Spezieller Teil.

In diesem zweiten Teile der Arbeit folgen meine Versuche, welche ich zur Erforschung der physiologischen Bedingungen für die Sporenbildung des Bacillus anthracis, subtilis und tumescens angestellt habe. Am Schlusse werde ich dann einige Tabellen anfügen, welche eine Uebersicht über die gefundenen Einflüsse der

Temperatur, verschiedener Nährsubstanzen und Salze auf das Wachstum und die Sporenbildung gestatten.

Die Untersuchungen wurden nach folgenden Richtungen hin ausgeführt und diesen entsprechend auch die Arbeit in 5 Unterabteilungen geteilt.

1) Einfluß der Ernährung;
2) Einfluß des Lichtes;
3) Einfluß der Temperatur;
4) Einfluß des Sauerstoffes;
5) Beziehungen des Wachstums zur Sporenbildung.

Alle Versuche wurden als Reinzüchtungen in den jedesmal näher bezeichneten Nährmedien, teils in Erlenmeyer'schen Kölbchen, Reagensröhrchen oder in Kulturen im hängenden Tropfen, teils als Agarkulturen auf schiefer Agarfläche in Reagensgläschen, sowie, wo nicht anders angegeben, bei konstanter Temperatur von 30° C und neutraler Reaktion des Nährbodens ausgeführt. Die Neutralisation geschah durch Zusatz von Natrium carbonicum zum Nährboden.

Bei den Beobachtungen gelangte ein Zeiß'sches Bakterienmikroskop mit Objekt F und Okular 3 zur Verwendung. Die Messungen wurden bei einer Tubuslänge von 160 mm mit gleicher Vergrößerung (790-fach) vorgenommen.

Bevor ich auf die Experimente eingehe, sei noch die Art der Gewinnung der Reinkulturen bei den drei in Frage stehenden Spaltpilzen erwähnt. Den Bacillus anthracis züchtete ich aus mit Sporen imprägnierten Seidenfäden, den Heubacillus erhielt ich als Reinkultur aus Heuaufgüssen, die ich 15 Minuten lang gekocht hatte. Der Bacillus tumescens endlich wurde, nach Angabe von A. Koch (88), von gekochten Daucuswurzeln gewonnen, worauf er in Gestalt weißer Schleimkolonieen wächst, und aus welchen ich ihn mit Hilfe des Koch'schen Plattenverfahrens isolierte.

1. Der Einfluß der Ernährung.

Was die Einwirkung verschiedener Nährmedien auf jene 3 Spaltpilze betrifft, so wurde dieselbe in der Weise vorgenommen, daß einfach das Wachstum und die Entwickelung der Bakterien von den Sporen ausgehend bis wieder zur Sporenbildung beobachtet und verglichen wurde. Im Nachfolgenden werde ich meine Befunde so wiedergeben, daß ich, mit den schlechter nährenden Substraten beginnend, zu den besseren aufsteige und zuerst diejenigen von unbestimmter und dann die von genau bekannter chemischer Zusammensetzung anführe.

Von sämtlichen untersuchten Nährmedien, worin überhaupt eine Auskeimung der Sporen stattfand, war im neutralen Pflaumendekokt bei allen 3 Bakterien die Vegetation am spärlichsten und schlechtesten. Die Zubereitung desselben geschah derart, daß entkernte Pflaumen $^1/_2$ Stunde im Wasser gekocht wurden und das erhaltene Extrakt, nach dem Erkalten klar filtriert, auf das spezifische Gewicht 1,004 gebracht wurde.

Beim Bacillus anthracis zeigt sich makroskopisch nach

20 Stunden eine zarte Wolke am Boden der Flüssigkeit, welche aus langen, wenig gekräuselten und dünnen Fäden von 0,8—1,0 μ Querdurchmesser besteht. Die Flocke vergrößert sich nur langsam und bleibt etwa erbsengroß. An einzelnen Fäden treten sehr bald krankhafte Krümmungen und Involutionsformen auf. Eine Sporenbildung erfolgt erst in 75 Stunden und zwar nur unvollständig und niemals innerhalb der kranken Fäden.

Etwas reichlicher als der Milzbrandbacillus entwickelt sich in der gleichen Zeit der Heubacillus. Derselbe bildet jedoch niemals lange Fäden, sondern tritt nur in 2,2—9,0 μ langen, 0,7 μ breiten, äußerst beweglichen Stäbchen auf, welche gleichfalls öfters an den Enden kolbige Anschwellungen erhalten. Nach 48 Stunden überzieht die Flüssigkeit ein zartes, durchscheinendes, braunes Häutchen, in welchem es in 60—65 Stunden zur Sporenbildung kommt.

Die geringste Entwickelung zeigt im Pflaumendekokt der Bacillus tumescens. Nach 24 Stunden sind nur ganz wenige, 1,8 bis 3,6 μ lange, 1,2—1,4 μ breite, schwach rotierende Stäbchen nachzuweisen. Die Zahl der Bacillen verringert sich aber mehr und mehr, ihr Inhalt wird sehr bald körnig und nur ausnahmsweise kann man nach 75 Stunden Sporenbildung beobachten.

Eine etwas bessere Ernährung als das Pflaumendekokt gestattet neutraler Heuauszug und eine neutrale 1-proz. Liebig's Fleischextraktlösung. Während sich der Bacillus subtilis in diesen beiden Nährmedien ziemlich gleich verhält, ist beim Milzbrandbacillus die Entwickelung im Fleischextrakte um ein Geringes reichlicher und die Sporenbildung vollständiger. Der Bacillus tumescens dagegen ist auch in diesen Substraten zu keinem ergiebigen Wachstume zu bringen und ebenso tritt die Sporenbildung nur in beschränktem Maße auf.

Der Heuauszug wurde, nach Angabe Buchner's (82, p. 212), aus Heu mit vorwiegend holzigen Stengelteilen bereitet, 4 Stunden bei 36° C extrahiert, nach dem Erkalten filtriert und auf das spezifische Gewicht 1,004 gebracht.

In einer auf diese Weise erhaltenen Nährflüssigkeit tritt der Bacillus anthracis in etwa erbsengroßer Flocke auf, welche aus wellig verlaufenden 1,2 μ breiten Fäden besteht. Innerhalb 70—72 Stunden kommt es dann in zahlreichen Fäden zur Sporenbildung. Der Bacillus subtilis läßt nach 18 Stunden in der getrübten Flüssigkeit außerordentlich bewegliche, 1,0 μ breite, 7,2—9,0 μ lange Stäbchen erkennen, welche sich allmählich auf der Oberfläche ansammeln und zu ziemlich langen Fäden (— 40,0 μ) auswachsen. Nach 36 Stunden beginnt die Hautbildung, welche sich uns in 42 Stunden als dicke, oft gefaltete und wie bestaubt aussehende, graue bis weiße Decke darbietet. Innerhalb 58 Stunden kommt es dann in derselben zur vollständigen Sporenbildung.

Die Entwickelung des Bacillus tumescens im Heuauszuge ist derjenigen im Pflaumendekokt ganz ähnlich. Auch hier nimmt die Zahl der nur schwach beweglichen Bacillen in der Flüssigkeit rasch ab, und nur ausnahmsweise ist nach 72—75 Stunden Sporenbildung zu konstatieren.

In 1-proz. neutraler Liebig's Fleischextraktlösung zeigt der Milzbrandbacillus ein verhältnismäßig gutes Wachstum. Die Fäden sind 1,2 μ breit und außerordentlich lang, dicht verschlungen und gedreht. Nach 60 Stunden kann man in fast allen Fäden die schönsten Sporen entwickelt sehen, welche ihnen ein perlschnurartiges Aussehen verleihen.

Die Entwickelung des Heubacillus geht hier in gleicher Weise vor sich wie im Heuauszuge, nur sind die Stäbchen etwas schmäler (0,8 μ) und kürzer, bis 7,0 μ und wachsen während der Hautbildung nicht zu solchen langen Fäden aus (—24,0 μ). Nach 58—60 Stunden ist auch in der Fleischextraktlösung die Sporenbildung eingetreten.

Der Bacillus tumescens trübt nach 18 Stunden die Flüssigkeit nur leicht und es treten 1,5 μ breite, 2,0—2,5 μ lange, schwach rotierende Stäbchen auf, welche nach 36 Stunden am Glase in der Höhe der Flüssigkeitssäule einen weißen Ring bilden. Während die Bacillen im Innern derselben ebenfalls verschwinden, ohne Sporen gebildet zu haben, tritt in diesem Ringe nach 65 Stunden vollständige Sporenbildung ein.

Außer diesen flüssigen Substraten habe ich auch noch feste Nährböden mit unbestimmter chemischer Zusammensetzung auf ihren Einfluß auf das Wachstum und die Sporenbildung geprüft. Zur Anwendung gelangten ein Gemisch von 1 Proz. Liebig's Fleischextraktlösung mit 1 Proz. Agar, ferner Kartoffeln. Beide Kulturböden gestatten allen 3 Bakterien ein sehr ergiebiges und scharf charakterisiertes Wachstum mit vollständiger Sporenbildung.

Auf schiefer Agarfläche tritt uns der Milzbrandbacillus nach 14 Stunden als ein zarter, grauer Belag entgegen, welcher sich bis zur 30. Stunde in einen dünnen, weißen, glänzenden und fein gelappten Ueberzug ausbildet. Die Fäden sind sehr lang, 1,2 μ breit, wellig und dicht verschlungen. In 54 Stunden ist vollständige Sporenbildung eingetreten.

Der Bacillus subtilis hingegen überzieht in 24 Stunden die ganze Fläche mit einer trockenen, matt glänzenden, grau-weißen Haut, welche sich stark verdickt und faltet. Die Bacillen sind etwas breiter als im reinen Fleischextrakte, aber durchschnittlich auch kürzer (0,8—1,0 μ breit und 5,2 μ lang) und haben sich in 50 Stunden zu glänzenden Sporen umgebildet.

Der Bacillus tumescens zeigt nach 24 Stunden einen dem Milzbrand ganz ähnlichen Belag, welcher ebenfalls deutlich gelappt ist, jedoch sind die einzelnen Lappen bedeutend dicker und größer als bei jenem. Die Bacillen erreichen eine Länge von 3,6 bis 9,0 μ und eine Breite von 1,5—1,8 μ und erzeugen in 50 Stunden die Sporen.

Die Bereitung der Kartoffeln zu Nährböden geschah nach dem von Esmarch angegebenen Verfahren. Auf der Kartoffel repräsentiert der Bacillus anthracis nach 14 Stunden weiße Pünktchen, welche zu einem trockenen, matt glänzenden Belage zusammenfließen. Bei einem Querdurchmesser von 1,5 μ treten neben hauptsächlich langen, gewellt verlaufenden Fäden auch kürzere Stäbchen von 7,0 bis 9,0 μ Länge auf. Die Sporenbildung erfolgt sehr früh, so daß dieselbe schon nach 43—45 Stunden beendet sein kann.

Der Heubacillus breitet sich als dicke, bräunliche bis weißliche, gefaltete Haut über die ganze Kartoffelfläche und selbst das angrenzende Glas aus. Die einzelnen Glieder sind 1,0 μ breit und nur 3,0—7,0 μ kurz. Später nimmt die Haut einen mehr schleimigen Charakter an und, während die Sporenbildung auf der Kartoffelfläche 48 Stunden beansprucht, ist dieselbe in der Haut am Glase schon nach 40—42 Stunden erfolgt.

Auch der Bacillus tumescens zeigt, wie der Bacillus anthracis und subtilis, auf Kartoffeln ein außerordentlich reichliches Wachstum und schnell eintretende Sporenbildung. Innerhalb 15 Stunden bildet er einen schmierigen, grau-weißen Belag, welcher aus 2,0 μ breiten und 3,6—10,0 μ langen Stäbchen besteht. Die Sporenbildung ist gewöhnlich schon nach 48 Stunden beendet.

Diese Züchtungsversuche wurden sehr oft wiederholt und alle auftretenden Phasen der Entwickelung jener Bakterien genau beobachtet. Die nun folgenden Untersuchungen habe ich mit Nährmedien von ganz bestimmter chemischer Zusammensetzung ausgeführt. Es kam darauf an, die Einflüsse der einzelnen Nährstoffe selbst sowohl auf das Wachstum wie auf die Sporenbildung mit Sicherheit festzulegen und zu eruieren, welche Stoffe und in welchen Konzentrationen dieselben überhaupt eine Auskeimung gestatten. Für die Zusammensetzung der Nährmedien waren die Prinzipien Naegeli's (82) über den Ernährungschemismus, welche er in seinen Untersuchungen über niedere Pilze niedergelegt hat, maßgebend.

Zur Prüfung gelangten als organische Stoffe Pepton, Asparagin, weinsaueres Ammoniak, Traubenzucker, Maltose, Glycerin, ferner die Salze Kalium phosphoricum, Kalium nitricum, Magnesium sulfuricum und Natrium chloratum. Der Einfluß des Calciums wurde außer Acht gelassen, da dasselbe, wie Winogradsky (84) bereits für Mycoderma vini nachgewiesen hat, zum Ernährungsprozesse der Bakterien bedeutungslos ist.

Um die Sporen des Bacillus anthracis, subtilis und tumescens zur Auskeimung zu veranlassen, erweist sich ein Vorhandensein von Stickstoff, Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, ferner Kalium, Magnesium, Phosphor und Schwefel im Nährmedium als unbedingt notwendig. Während jedoch der Bacillus subtilis außer Pepton auch noch einfachere Verbindungen, wie Asparagin, weinsaueres Ammoniak verarbeiten kann, ist dies dem Bacillus anthracis und tumescens nicht möglich. Die Salze kommen am besten in Gestalt von Kalium phosphoricum und Magnesium sulfuricum zur Anwendung und bei einem Gehalte von 1 Proz. Pepton zeigen sich für den Ablauf der Vegetation 0,1 Proz. Kalium phosphoricum und 0,05 Proz. Magnesium sulfuricum am vorteilhaftesten. Da der Entwickelungsgang des Bacillus anthracis, subtilis und tumescens in einer auf diese Weise bereiteten Nährflüssigkeit immer konstant bleibt und typisch verläuft, so habe ich eine filtrierte, neutrale Lösung von 1 Proz. Pepton, 0,1 Proz. Kalium phosphoricum uud 0,05 Proz. Magnesium sulfuricum in den weiter anzureihenden Versuchen als Ausgangsmedium benutzt.

Der Milzbrandbacillus tritt hierin nach 12 Stunden in Gestalt

einer haselnußgroßen Wolke auf, welche sich schon makroskopisch als ein dicht verflochtenes, sehr elastisches Netzwerk darbietet. Unter dem Mikroskop geben sich die Fäden als feine, homogene, haargeflechtartig verschlungene Bündel kund, deren einzelne Glieder 1,5 μ breit sind. Nach 54 Stunden haben sich dieselben in die schönsten Sporenketten umgewandelt.

Der Heubacillus trübt bereits nach 7 Stunden die Nährlösung, worin er in reichlichster Menge auftritt. Die Stäbchen sind bei ihrer großen Dicke (1,2 μ) nur kurz (7,2—9,0 μ) und zeigen eine geringe, meist um die Längs- oder Querachse rotierende Beweglichkeit. Schon nach 24 Stunden sammeln sie sich an der Oberfläche an, wachsen etwa zur doppelten Länge aus und bilden eine grau-weiße, dicke, oft gefaltete Haut, welche in 50—54 Stunden mit Sporen dicht durchsetzt ist.

Im Gegensatze zu den peptonfreien Nährböden ist die Entwickelung des Bacillus tumescens in peptonhaltigen enorm gesteigert und er zeigt das schon im ersten Teile näher beschriebene, charakteristische Aussehen. 5 Stunden nach der Impfung beginnt die Flüssigkeit sich zu trüben, die 1,8—2,0 μ dicken Bacillen sind etwas leichter beweglich und streben nach der Oberfläche zu. Hier wachsen sie indessen nicht zu langen Fäden aus, sondern gehen sehr schnell Spaltungen ein und bleiben 5,0—7,0 μ kurz. Innerhalb 20 Stunden bildet sich die schon erwähnte, fettig glänzende Decke, welche nach 48 Stunden zu einer Sporenhaut verwandelt wird.

Die höheren Konzentrationen des Peptons werden von den drei Spaltpilzen gleichmäßig und vorzüglich ertragen. Es hat den Anschein, als ob dasselbe überhaupt keinen schädigenden Einfluß ausübe, sondern nur die Vegetation begünstige. Je mehr aber das Wachstum gesteigert wird, um so schneller tritt auch die Sporenbildung ein, so daß sich dieselbe schon nach 36—40 Stunden vollzogen haben kann. Eine konstante Wirkung des Peptons, die mit steigender Konzentration besonders deutlich erscheint, ist das Auftreten kurzer und breiter Stäbchen. In einer Lösung von 20 Proz. Pepton, 0,5 Proz. Kalium phosphoricum und 0,1 Proz. Magnesium sulfuric. sind selbst beim Milzbrandbacillus kürzere Fadenstücke von 7,0—20,0 μ Länge eine regelmäßige Erscheinung. Leider konnte für das Pepton die oberste Grenzkonzentration nicht ermittelt werden, da sich dasselbe über 20 Proz. nur unvollständig löste.

Die vereinigten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen des Asparagin und weinsaueren Ammoniak sind, wie schon erwähnt, nur für den Bacillus subtilis zugänglich. Auch die höheren Konzentrationen oder Zusätze zu Peptonlösungen üben selbst auf diesen Bacillus keine begünstigende Wirkung aus, vielmehr hört bei einem Gehalte von über 10 Proz. Asparagin und 17 Proz. weinsauerem Ammoniak auch beim Heubacillus das Wachstum auf.

In einer Nährlösung von 1 Proz. Asparagin, 0,1 Proz. Kalium phosphoricum und 0,05 Proz. Magnesium sulfuricum ruft derselbe nur eine ganz schwache Trübung hervor, seine Beweglichkeit ist erhöht und bei einer Länge von 2,5—5,0 μ beträgt seine Breite 0,6 μ. Eine Hautbildung habe ich niemals beobachtet, wohl aber häufig

Endanschwellungen und bauchige Auftreibungen einzelner Stäbchen. Die Sporenbildung erfolgt nur sehr langsam und unvollständig, erst nach 80 Stunden findet man dieselbe und zumeist in den bauchig aufgetriebenen Gliedern, deren Querdurchmesser durch die Sporen dann nicht vollständig ausgefüllt wird.

In 1-proz. weinsauerem Ammoniak mit Nährsalzen entwickelt sich der Heubacillus ganz ähnlich, nur werden hier die Stäbchen um ein geringes länger (—9,0 μ), und Involutionsformen sind eine seltenere Erscheinung.

Unter den reinen Kohlenstoffverbindungen sind als vorzügliche Nährstoffe der Traubenzucker, die Maltose und das Glycerin zu erwähnen. Wie jedoch Pepton beschleunigend auf den Ablauf der Vegetation des Bacillus anthracis, subtilis und tumescens einwirkt, so rufen diese Stoffe ein langsames Wachstum hervor und schieben unter den gewöhnlichen Verhältnissen das Eintreten der Sporenbildung weit hinaus. Infolge dieser Eigenschaft aber wachsen die Bakterien in Peptonlösungen bei Gegenwart jener Verbindungen zu sehr langen Fäden aus, wie ich es im ersten Teile für den Bacillus subtilis angegeben habe und die Messungen in den angefügten Tabellen erweisen. Während 1,0 und 3,0 Proz. Traubenzuckergehalt die Entwickelung vollständig gleichmäßig und gut gestalten, rufen schon 5,0 Proz., namentlich bei schlecht nährender Stickstoffquelle, stets aber 10,0 Proz. Traubenzucker Involutionsformen der verschiedensten Gestalt und Plasmolyse hervor. Die Sporenbildung erfolgt 20—24 Stunden später als in Nährlösungen ohne Traubenzucker und Lösungen über 15 Proz. gestatten den Bakterien überhaupt keine Vegetation mehr. Gleich dem Traubenzucker verhält sich auch die Maltose, nur daß dieselbe in geringerer Konzentration vertragen wird. Als Grenzkonzentrationen habe ich für den Milzbrandbacillus 6,0 Proz., den Bacillus tumescens 7,0 Proz. und den Heubacillus 10,0 Proz. Maltose bestimmt. Mit der Ausnahme, daß die Stickstoffquellen nicht allzu schlecht ernähren, wie dies beim Asparagin und weinsaueren Ammoniak der Fall ist, habe ich innerhalb der angegebenen Grenzen bei der Maltose niemals Involutionsformen beobachtet. Der Bacillus tumescens und subtilis wachsen zu langen schmalen Fäden aus, und die Sporenbildung nimmt 10—14 Stunden länger in Anspruch als dieselbe ohne Maltose gebrauchen würde. Glycerin endlich bedingt gleichfalls ein sehr ergiebiges Wachstum, wobei freilich auch die Sporenbildung um 12 Stunden verzögert wird. Bei einem Gehalt von über 5,0 Proz. Glycerin ist für den Milzbrandbacillus, 10 Proz. für den Bacillus tumescens und 12 Proz. für den Heubacillus keine Vegetation mehr möglich.

Was den Bacillus tumescens anbetrifft, so vermögen diese drei Kohlenstoffverbindungen, trotzdem sie das Wachstum reichlicher und besser gestalten, bei schlecht nährender Stickstoffquelle niemals Hautbildung hervorzurufen. Setzen wir z. B. zu einer 1,0-proz. neutralen Liebig's Fleischextraktlösung 3 Proz. Traubenzucker, Maltose oder 1 Proz. Glycerin, so wird das Wachstum von dem bereits beschriebenen mit Ausnahme der Länge der Stäbchen nicht wesentlich

geändert, höchstens daß der weiße Bacillenring am Rande der Flüssigkeit um ein Geringes breiter wird.

Im Anschluß hieran sei der Einfluß höher konzentrierter Fleischextraktlösungen erwähnt. Für den Milzbrandbacillus bedeuten 8 Proz. derselben das beste und reichlichste Wachstum mit am schnellsten eintretender Sporenbildung, 12 Proz. aber stellen schon das Maximum dar. Der Heubacillus hingegen verträgt bedeutend höhere Konzentrationen, sein Wachstumsoptimum liegt bei 25 Proz., erst von 40 Proz. an wird die Vegetation kümmerlich und 45 Proz. ist die oberste Grenze. Der Bacillus tumescens zeigt das beste Wachstum und die schnellste Sporenbildung bei 16 Proz., hier kann bei nicht allzu hoher Flüssigkeitssäule (10 mm) bisweilen schon eine Hautbildung beobachtet werden. Das Maximum liegt bei 23 Proz., wo alle Entwickelung aufhört.

In gleicher Weise wie diese Kohlenstoffquellen wurden auch die erwähnten Salze in ihren Beziehungen auf das Wachstum und die Sporenbildung geprüft, indem dieselben in den einzelnen Konzentrationen einer 1proz. Peptonnährlösung zugesetzt wurden. Die Dauer des Entwickelungsganges sowie die Größenmasse der Bakterien habe ich wieder in einer Tabelle am Schlusse zur Uebersicht gebracht.

Gegenüber Kalium phosphoricum, welches in Konzentrationen von 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 Proz. angewendet wurde, verhalten sich die drei Spaltspilze sehr übereinstimmend. Der Gehalt von 0,1 Proz. im Nährmedium verursacht das beste Wachstum und die schnellste und reichlichste Sporenbildung. Die höheren Konzentrationen verlangsamen dagegen die Vegetation und rufen Involutionsformen hervor. Während Lösungen bis zu 3 Proz. Kalium phosphoricum ein gesteigertes und langanhaltendes Schwärmstadium des Heubacillus bedingen, wird dasselbe bei steigender Konzentration verlangsamt oder fehlt ganz, und es kommt dann beim Bacillus subtilis und tumescens keine Hautbildung mehr zustande. Die oberste Grenze stellen für den Milzbrandbacillus 3 Proz., für den Heubacillus und Bacillus tumescens 5 Proz. Kalium phosphoricum im Nährboden dar.

Kalium nitricum gelangte in Konzentrationen von 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,0; 13,0 Proz. zur Anwendung und übte besonders auf den Bacillus subtilis eine das Wachstum begünstigende Wirkung aus. Ein Gehalt von 1 Proz. im Nährsubstrat läßt hauptsächlich die einzelnen Entwickelungsstadien scharf hervortreten und die Bacillen nehmen an Länge bedeutend zu. Konzentrationen bis zu 3 Proz. bleiben für den Bacillus tumescens ohne Einfluß, erst hier setzt die das Wachstum verzögernde Wirkung ein, welche die Sporenbildung um einen ganzen Tag hinausschiebt. Die Regelmäßigkeit des Entwickelungsganges wird von hier an für alle drei Bakterien aufgehoben, es machen sich Plasmolyse des Inhaltes der Zellen, sowie Involutionsformen geltend und der Bacillus subtilis und tumescens verlieren die Fähigkeit der Hautbildung. Als Grenzkonzentrationen fand ich für den Bacillus anthracis 7,0 Proz., den Bacillus tumescens 10,0 Proz. und den Bacillus

subtilis 12,0 Proz. (Fischer, 95, 21 Proz.) Kalium nitricum in der Nährflüssigkeit.

Wie Kalium phosphoricum so gehört auch Magnesium sulfuricum zum Zustandekommen einer Auskeimung und Entwickelung der Spaltpilze, deren Optimum bei 0,05 Proz. liegt. Schon 0,1 Proz. ruft eine bemerkbare Verzögerung bis zum Eintreten der Sporenbildung hervor, und bei 1,0 Proz. treten Involutionsformen auf, dabei kann die Hautbildung und das Schwärmstadium fehlen sowie der Zellinhalt plasmolysieren. Das Wachstumsmaximum ist für den Bacillus anthracis bei 2,0 Proz., dem Bacillus subtilis und tumescens bei 5,0 Proz. zu suchen.

Die Erscheinungen, welche ein Zusatz von Natrium chloratum zur Nährflüssigkeit auf das Wachstum und die Sporenbildung hervorrufen, sind hauptsächlich verzögernde, außerdem kommen noch bei Konzentrationen über 4 Proz. Plasmolyse und bei dem Bacillus subtilis und tumescens Aufhören des Schwärmstadiums und der Hautbildung hinzu. Die höchsten Konzentrationen, welche von den Bakterien vertragen werden, sind für den Bacillus anthracis 4,0 Proz. (Freytag, 85, 6—10 Proz.), für den Bacillus subtilis und tumescens 7,0 Proz. (Fischer, 95, Bacillus subtilis 12 Proz.), doch treten dabei überall verkümmerte Stäbchen und Involutionsformen auf.

Wenn wir die aus den Züchtungsversuchen gemachten Beobachtungen zusammenfassen, so finden wir, daß alle diejenigen Substanzen, welche das Wachstum beschleunigen, anscheinend die Sporenbildung befördern, während die das Wachstum verzögernden Stoffe die Sporenbildung oft weit hinausschieben. Zu ersteren gehört das Pepton, zu letzteren die erwähnten Kohlenstoffverbindungen und Salze.

Alle diese Untersuchungen wurden bei neutraler Reaktion des Nährbodens ausgeführt. Im Folgenden soll nun auch geprüft werden, inwieweit die alkalische oder saure Reaktion das Wachstum und die Sporenbildung beherrschen. Um die alkalische Reaktion in verschiedener Stärke zu erhalten, habe ich neutraler Peptonnährlösung Natrium carbonicum in Konzentrationen von 0,1; 1,0; 2,0; 3,0 und 5,0 Proz. zugesetzt. Das Wachstum der Bakterien zeigte nun, daß eine geringe alkalische Reaktion das Wachstum befördert und die Sporenbildung eher eintreten läßt. Das Optimum liegt für den Bacillus anthracis bei 0,5—1,0 Proz., für den Bacillus subtilis und tumescens aber um etwas höher, bei 2,0 Proz.; das Maximum dagegen bei ersterem Spaltpilz bei 3,0 Proz., bei den letzten beiden bei 5,0 Proz.

Die sauere Reaktion wurde durch Zusatz von Weinsäure in Konzentrationen von 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 Proz. geprüft. Hierbei ergab sich, daß der Bacillus anthracis nur 0,3 Proz., der Bacillus subtilis und tumescens aber bis zu 1,0 Proz. Weinsäure vertragen. Man macht jedoch bei Anwendung sauerer Substrate die Beobachtung, daß die Intensität der Sporenbildung äußerst gering wird, weshalb die Zahlen in der beigefügten Tabelle nur im Mittel Giltigkeit erlangen.

Endlich wurde auch die Grenze der natürlichen saueren Reaktion

im Liebig'schen Fleischextrakte für die Vegetation der Bakterien zu bestimmen gesucht. Dieselbe liegt beim Bacillus anthracis zwischen 7,0 und 10,0 Proz., für den Heubacillus aber und den Bacillus tumescens bei 18 Proz. der Lösung.

2. Der Einfluß des Lichtes.

Das Licht hat nur eine untergeordnete Bedeutung für das Wachstum und die Sporenbildung. Dunkelheit und diffuses Tageslicht üben weder einen hemmenden noch begünstigenden Einfluß sowohl auf das Wachstum wie auf die Sporenbildung aus und sind deshalb für die Versuche völlig gleichgültig. Direkte Sonnenstrahlen dagegen hemmen die Entwickelung; setzt man die Sporen des Milzbrandes, worauf schon Arloing (87) aufmerksam gemacht hat, 2 Stunden den Strahlen der Sommersonne aus, so verlieren sie ihre Keimfähigkeit. Ich habe meine Versuche derartig angestellt, daß die durch die Sonnenstrahlen bedingte Erwärmung ausgeschlossen wurde. Indem ich die Versuchsröhrchen in fließendes Wasser tauchte und so den Sonnenstrahlen aussetzte, wurde auch hierbei jene Beobachtung bestätigt, nach zweistündiger Einwirkung keimten die Sporen des Bacillus anthracis nicht mehr aus. Das Gleiche gilt auch für den Bacillus tumescens, während die Sporen des Bacillus subtilis 3 Stunden lang die direkten Sonnenstrahlen ertragen, ehe sie ihre Keimfähigkeit verlieren.

Setzt man nun die vegetativen Formen, wenn sie auf der Höhe der Entwickelung stehen, den Strahlen in gleicher Weise aus, so findet man, daß dieselben bedeutend empfindlicher sind. Der Bacillus anthracis bildet bereits nach 15 Minuten langer Einwirkung keine Sporen mehr, sondern stirbt ab, der Bacillus tumescens erträgt die Sonnenstrahlen 40 Minuten lang, der Heubacillus dagegen über 1 Stunde, ehe die Sporenbildung aufhört. Bevor die Bakterien absterben, wird ihr Inhalt körnig, das Protoplasma kontrahiert sich und die mannigfaltigsten Involutionsformen treten auf.

3. Der Einfluß der Temperatur.

Da alle bisher angeführten Versuche bei einer konstanten Temperatur von 30° C ausgeführt wurden, handelt es sich jetzt darum, auch den Einfluß der Temperaturen auf die Sporenbildung zu bestimmen. Für den Bacillus anthracis (R. Koch, 76) und subtilis (Cohn, 76; Brefeld, 81) sind dieselben bereits genau bekannt, es fehlen hierüber nur für den Bacillus tumescens die Angaben. Diese Temperaturbestimmungen habe ich nun vorgenommen, gleichzeitig aber auch die des Bacillus anthracis und subtilis wiederholt, um selbst die Beziehungen des Wachstums zur Sporenbildung zu prüfen. Zur genaueren Uebersicht habe ich die Befunde gleichfalls in einer Tabelle vereinigt. Der Einfluß der Temperaturen für das Zustandekommen der Sporenbildung ist nur sehr gering anzuschlagen. Das Temperaturoptimum liegt beim Bacillus anthracis bei 34° C, dem Bacillus subtilis und

tumescens bei 30° C, hier tritt bei gleichmäßiger Entwickelung die Sporenbildung sehr zeitig auf. Mit dem Sinken der Temperatur nimmt nicht das Wachstum ab, sondern nur die Dauer der Vegetation wird hinausgeschoben. Unter 8° C findet beim Bacillus subtilis kein Wachstum mehr statt, die Sporenbildung hört indessen schon früher auf (10° C). Für den Bacillus tumescens liegt das Minimum des Wachstums bei 10° C, das der Sporenbildung bei 11° C. Der Bacillus anthracis zeigt bei 12° C noch ein geringes Wachstum, nie habe ich aber unter 14° C Sporenbildung beobachten können. Zu hohe Temperaturen beeinflussen das Wachstum nachteilig, so daß sich sehr leicht Krankheitserscheinungen geltend machen, welche in Plasmolyse und Involutionsformen zum Ausdruck kommen. Während der Bacillus subtilis und tumescens unbeschadet Temperaturschwankungen ertragen, und dieselben nur die Schnelligkeit des Ablaufes der Entwickelung bis zur Sporenbildung beeinflussen, so schädigen plötzliche und erhebliche Schwankungen auch innerhalb der Wachstumsgrenze den Bacillus anthracis erheblich und stellen die Sporenbildung in Frage. Läßt man ihn z. B. bei 37° auskeimen und verbringt ihn darauf nach 14 Stunden in Zimmertemperatur, welche sich bei meinen Versuchen durchschnittlich um 18° C bewegte, so treten sofort Involutionserscheinungen auf, und die Sporenbildung ist ganz unvollkommen. Ist aber die Temperaturschwankung nicht so stark, wie z. B. von 30° auf 20° C, so passen sich die vegetativen Zellen der neuen Temperatur an, und die Vegetation geht, wenn auch verzögert, unbeschadet zu Ende.

4. Der Einfluß des Sauerstoffes.

Alle dargestellten Versuche sind unter der Voraussetzung ausgeführt worden, daß der Luftsauerstoff ungehindert zu den Kulturen gelangen kann, und die Resultate treten infolgedessen auch dann nur mit Sicherheit ein. Der Sauerstoff der Luft spielt bei den aerobiontischen Bakterien, wie wir gleich durch Experimente bestätigen werden, für das Zustandekommen der Sporenbildung eine hervorragende Rolle. Da aber die Milzbrandbacillen unbeweglich sind und in flüssigen Medien am Boden vegetieren, so ist, um freien Sauerstoff zu ihnen treten zu lassen, auch dieser Umstand zu berücksichtigen und die Flüssigkeitssäule nicht zu hoch zu machen. Um dies zu beweisen und eine Grenze dafür anzugeben, stellen wir folgenden Versuch an: Von 3 Reagensröhrchen von 150 mm Höhe und 15 mm Durchmesser wird das eine $^3/_4$, das andere zur Hälfte und das dritte $^1/_4$ mit Nährlösung (Peptonnährlösung) angefüllt und nach erfolgter Sterilisation mit Milzbrandsporen geimpft. Der Verschluß der Röhrchen ist mit Watte hergestellt worden. In allen 3 Gefäßen wird bei einer Temperatur von 30° C die Auskeimung der Sporen und die Entwickelung der Milzbrandwolke gleichmäßig und wie wir dieselbe früher gefunden haben vor sich gehen. Aber, während sich in den Fäden des zu $^1/_4$ gefüllten Gläschens nach 54 Stunden Sporen gebildet haben, zeigen die der beiden anderen Gefäße nichts davon.

Erst nach 3 Tagen werden in den oberflächlichsten Fäden des zur Hälfte gefüllten Glases einzelne Sporen nachzuweisen sein, eine vollständige Sporenbildung tritt jedoch nicht ein. In dem dritten Reagensröhrchen kommt es niemals zur Sporenbildung, sondern nach 5 Tagen zerfallen die Fäden körnig und sterben ab. Dasselbe Schicksal widerfährt auch den Bacillen des zweiten Gläschens, welche sich in der Tiefe befinden und keine Sporen gebildet haben. Durch Probieren und Beobachten verschieden hoch gefüllter Kulturröhrchen kommen wir zu dem Resultate, daß eine Flüssigkeitsmenge bis zu 15 mm Höhe über der Milzbrandwolke das Zustandekommen der Sporenbildung nicht hemmt. Höhere Flüssigkeitsschichten dagegen verlangsamen die Sporenbildung, machen sie unvollständig und heben sie ganz auf.

Machen wir nun dasselbe Experiment mit dem Bacillus subtilis und tumescens, so wird die Entwickelung in allen Gefäßen die gleiche sein wie wir sie aus den früheren Versuchen kennen gelernt haben, und die Sporenbildung wird ohne Hindernisse zu stande kommen. Stellen wir aber den Versuch so an, daß anstatt des Watteverschlusses ein solcher mit Kork und Paraffin gemacht wird, dann wird sich auch hier dieselbe Beobachtung, welche am Milzbrandbacillus gefunden wurde, bestätigen. Ohne daß das Wachstum bei beiden Bakterien auffallend verringert ist, werden wir nie bei derartiger Züchtung ein Schwärmstadium, eine Haut und Sporenbildung eintreten sehen. Durch Probieren ermitteln wir auch bei diesen Züchtungen, daß zum Ablauf einer normalen Entwickelung für den Bacillus subtilis mindestens 3 ccm Luft über der Flüssigkeitssäule sich befinden müssen, für den Bacillus tumescens sind sogar 5 ccm nötig.

Auf Grund aller dieser Untersuchungen komme ich zu dem Schlusse, daß die Sporenbildung aërober Bakterien außer von gutem Nährmaterial hauptsächlich von reichlichem Vorhandensein freien Sauerstoffes abhängt. Dieser erscheint neben den unerschöpflich reichen Nährstoffen als die spezifische Bedingung, warum innerhalb des uneröffneten tierischen Organismus niemals Sporenbildung zu stande kommt. Infolge meiner Befunde muß ich im Gegensatz zu Buchner (90) auch dem Sauerstoff eine spezifische Bedeutung beilegen, denn während der gebundene Sauerstoff, welcher nur in geringer Menge von den Bakterien entzogen wird, für das Wachstum ausreicht, so langt derselbe doch nicht zur Bildung der Dauerformen, und die Bakterien sind nach Erschöpfung auch des besten Nährmaterials dem Tode geweiht. Ferner suche ich den Grund, warum in zuckerhaltigen Nährlösungen das Eintreten der Sporenbildung oft weit hinausgeschoben wird, in der den Sauerstoff absorbierenden Eigenschaft des Zuckers.

5. Die Beziehungen des Wachstums zur Sporenbildung.

Daß Beziehungen zwischen Wachstum und Sporenbildung bestehen, haben bereits die verschiedenen Züchtungsversuche gelehrt, und die Sporenbildung ist danach der Ausdruck plötzlicher Wachstumshemmung unter den sonst günstigsten äußeren Bedingungen.

Im Folgenden soll es unsere Aufgabe sein, diese Korrelation experimentell zu verwerten und durch willkürliche Eingriffe zu erhöhen beziehungsweise zu beseitigen. Die Befunde Buchners (90), daß destilliertes Wasser und 2-proz. Kochsalzlösung die Sporenbildung befördern, dienen nun als Ausgangspunkt für die neuen Versuche. Wir nehmen aus einer gut ernährten Kultur, z. B. Peptonnährlösung, nach 24stündigem Wachstume die Flocke des Bacillus anthracis, die Haut von Bacillus subtilis und tumescens und bringen sie in sterile Gefäße (Glasklötzchen) teils mit etwa 1 ccm destilliertem Wasser, teils mit gleicher Menge 2-proz. Kochsalzlösung, so daß wohl der Sauerstoff ungehindert hinzutreten kann, das Verdunsten der Flüssigkeit aber und eine Verunreinigung derselben verhindert ist. Kontrolieren wir nun von Zeit zu Zeit, so werden wir finden, daß im destillierten Wasser nach 12 Stunden, in der 2-proz. Kochsalzlösung sogar schon nach 10 Stunden, vollständige Sporenbildung eingetreten ist. Die Beobachtung Buchner's hat sich also bestätigt, der Entwickelungsgang ist beim Milzbrandbacillus im destillierten Wasser um 18, in der 2-proz. Kochsalzlösung um 20 Stunden abgekürzt worden; bei dem Bacillus subtilis und tumescens beträgt die Beschleunigung 14 bezw. 16 Stunden.

Verwenden wir nun eine 20 Stunden alte Kultur der Spaltpilze zu den gleichen Versuchen, so werden wir zu ganz denselben Resultaten gelangen, hierbei ist das letzte Stadium der Entwickelung im destillierten Wasser schon nach 32 Stunden, in einer 2-proz. Kochsalzlösung nach 30 Stunden, erreicht. Um ganz junge Kulturen zu unseren Versuchen zu verwenden, greifen wir zu festen Nährböden, damit eine gleichzeitige Uebertragung von Nährstoffen möglichst vermieden wird, was ein Haupterfordernis ist. Benützen wir auf diese Weise den Belag von schiefer Agarfläche, welche aus 1 Proz. Liebig's Fleischextrakt mit 10 Proz. Pepton und 1 Proz. Agar bereitet ist, nach 10-stündigem intensiven Wachstum, so ergiebt sich, daß in der 2-proz. Kochsalzlösung nach 10—12 Stunden, im destillierten Wasser nach 14 Stunden, Sporenbildung eingetreten ist. Dasselbe Experimeut mit einer 6 Stunden alten Kultur ausgeführt, ergiebt sowohl für den Milzbrandbacillus wie für den Bacillus subtilis und tumescens das gleiche Resultat. Da aber die jungen Bakterien auch auf schiefer Agarfläche unter 6 Stunden keinen mit bloßen Augen sichtbaren Belag mehr bilden, habe ich mit diesem Agarnährboden Kulturen im hängenden Tropfen angefertigt und die Zeit der Auskeimung und bis zur ersten Teilung zu bestimmen gesucht. Für den Bacillus anthracis fand ich, daß die ersten Sporen bei einer Temperatur von 30° C nach 4 Stunden ausgekeimt hatten und bis zum Auswachsen zur doppelten Länge 25 Minuten Zeit verging. Beim Bacillus subtilis und tumescens hatten nach 4 Stunden schon die meisten Sporen ausgekeimt. Für den ersteren Spaltpilz erwies sich im Mittel ein Zeitraum von 3 Stunden 35 Minuten, für den letzteren ein solcher von 3 Stunden 20 Minuten zum Auskeimen der ersten Sporen als nötig. Bis zur ersten Teilung verging bei beiden Bakterien durchschnittlich 20 Minuten Zeit. Brachte ich nun die jungen Bacillen des Bacillus anthracis

nach 5 Stunden, die des Bacillus subtilis und tumescens nach 4 Stunden in Kulturen im hängenden Tropfen mit destilliertem Wasser beziehentlich Kochsalzlösung, so trat ebenfalls hier nach 12—14 Stunden Sporenbildung ein. Auf diese Weise gelang es, den Bacillus anthracis etwa nach der 5. Teilung, den Bacillus subtilis und tumescens aber schon nach etwa der 3. Teilung zur Sporenbildnng zu veranlassen. Nach diesen Beobachtungen ist auch der Schluß nicht unberechtigt, daß die endosporen Bakterien sofort nach der Auskeimung befähigt sind, Sporen zu bilden.

Als meine nächste Aufgabe betrachtete ich nun, auch andere Stoffe zu finden, welche die Sporenbildung auf diese Weise befördern wie destilliertes Wasser und Kochsalz. Infolge dessen wiederholte ich diese Versuche mit allen jenen Stoffen, welche ich in meinen Züchtungsversuchen angewendet hatte und zwar so, daß sie allein in verschiedener Konzentration im destillierten Wasser gelöst wurden. Hierbei bestätigte es sich, daß alle Momente, welche das Wachstum hemmen, die Sporenbildung befördern. Natrium carbonicum, Magnesium sulfuricum, Natrium chloratum, destilliertes Wasser, Kalium phosphoricum, Kalium nitricum, Glycerin stellen eine Reihe dar, welche das Eintreten der Sporenbildung befördern. 2 Proz. Natrium carbonicum und 1 Proz. Magnesium sulfuricum vermögen schon nach 8—10-stündiger Einwirkung, 2 Proz. Natrium chloratum nach 12, destilliertes Wasser nach 14, 2 Proz. Kalium phosphoricum, 6 Proz. Kalium nitricum und 3 Proz. Glycerin aber erst nach 18—20 Stunden Sporenbildung hervorzurufen.

Um nun den Entwickelungskreislauf der Bakterien vollständig in der Hand zu haben, gehört auch noch, daß man, ohne das Wachstum zu schädigen, die Sporenbildung hinausschieben und vollständig hindern kann. Hinausgeschoben wird dieselbe, wie wir bereits kennen gelernt haben, durch niedere Temperaturen und durch Zusatz der Wachstum verzögernden Stoffe in den ermittelten Konzentrationen, welche dasselbe nicht krankhaft machen.

Verhindert wird die Sporenbildung einmal durch fortwährende Erneuerung der das Wachstum befördernden Nährstoffe. Schon Buchner (90) erwähnt die Thatsache, daß, wenn man regelmäßig die Nährlösung erneuert, bevor die Entwickelung der Milzbrandbacillen einen gewissen Punkt erreicht, man ungezählte Generationen von bloß vegetativen Zuständen erhalten kann. Auf diese Weise habe ich den Heubacillus 4 Monate hindurch in 69 Generationen fortgezüchtet, ohne daß jemals Sporenbildung eingetreten wäre. Dasselbe Experiment habe ich mit dem Bacillus anthracis und tumescens 3 Monate lang durch 48 Generationen gemacht. Es sei erwähnt, daß die Bakterien bis zu den letzten Generationen weder eine Aenderung in der Vegetation erlitten, noch die Tendenz zur Sporenbildung verloren haben. Uebersieht man aber nur ein einziges Mal den richtigen Zeitpunkt für die Ueberimpfung in neue Nährlösung, so tritt auch in dem besten Nährsubstrat unfehlbar Sporenbildung ein. Für eine Nährflüssigkeit von 1 Proz. Liebig's Fleischextraktlösung mit 1 Proz. Pepton suchte ich nun jenen Zeitpunkt zu bestimmen. Derselbe liegt bei 30° C für den Milzbrand-

bacillus über der 48. Stunde, bei Bacillus subtilis und tumeseens bei der 42. Stunde.

Die andere Methode, die Sporenbildung zu hindern und nur die vegetative Form zu erhalten, ohne die Kulturen einer so genauen Kontrolle, wie der vorhergehende Versuch erheischt, unterwerfen zu müssen, ist die Züchtung bei mangelhaftem Luftzutritt. In Reagensröhrchen, welche ich zu $^4/_5$ mit Nährflüssigkeit anfüllte und mit Korkpfropfen und Paraffin luftdicht verschloß, habe ich den Bacillus anthracis, subtilis und tumescens 5 Wochen lang durch 8 Generationen fortgezüchtet, ohne jemals Sporenbildung zu erhalten. In solchen Kulturen ist das Wachstum ungehemmt und die Bacillen bleiben 5 Tage lang lebensfähig, nach dem 6. Tage aber wird das Bakterienprotoplasma körnig und zerfällt schließlich, weshalb ich in meinen Versuchen die Bakterien am 5. Tage auf frische Nährböden überimpfte. Auch bei diesen Züchtungen verloren alle 3 Spaltpilze bei unverändertem, gutem Wachstume nach der 8. Generation nicht die Fähigkeit der Sporenbildung. Sowie man auf diese Kulturen freien Sauerstoff der Luft einwirken läßt, tritt der typische Ablauf der Entwickelung ein.

Am Schlusse meiner Arbeit angelangt, erübrigt es noch, die Resultate der Untersuchungen über die physiologischen Bedingungen der endogenen Sporenbildung zusammenzufassen.

1) Dauerndes, lebhaftes Wachstum unter den günstigsten Bedingungen ruft niemals Sporenbildung hervor.

2) Ungenügende Ernährung und ungünstige äußere Bedingungen stellen die Sporenbildung sehr in Frage bezw. heben sie ganz auf.

3) Plötzliche Hemmung des Wachstums nach vorausgegangener guter Ernährung veranlaßt zu jeder Zeit sofort schnell und vollständig Sporenbildung.

4) Speziell das Wachstum hemmende und infolgedessen die Sporenbildung befördernde Substanzen sind Natrium carbonicum, Magnesium sulfuricum, Natrium chloratum und destilliertes Wasser.

5) Der Sauerstoff der Luft ist für die Bildung der Sporen aërober Bakterien eine spezifische und notwendige Bedingung.

Ob nun in einem Substrate, wie z. B. einer Fleischextraktlösung, die Erschöpfung des Nährmaterials oder andere das Wachstum hemmende Momente die direkte Ursache der Sporenbildung sind, darüber lassen die Befunde dieser Arbeit noch keinen sicheren Schluß zu. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, daß Stoffwechselprodukte die Veranlassung der Sporenbildung sein sollen. Ich habe gut ernährte Bakterien in Nährlösungen gebracht, worin schon wiederholt sich Sporen gebildet hatten, aber in keinem Falle konnte eine Beförderung der Sporenbildung beobachtet werden, vielmehr trat dieselbe stets langsamer (bis zu 36 Stunden) als in den Stammkulturen und bedeutend später als in destilliertem Wasser ein. Es wird daher eine Ungleichheit in der Zusammensetzung oder auch Erschöpfung des Nährbodens die wahrscheinliche Veranlassung zur endogenen Sporenbildung sein, so daß H. Buchner mit seiner Ansicht der Wirklichkeit am nächsten gekommen ist, jedoch insofern irrt, als der Mangel

an Nahrungsstoffen nicht die direkte Ursache der Sporenbildung ist, sondern nur eine Hemmung des Wachstums bedingt.

Die Sporenbildung der untersuchten Bakterien verhält sich analog der geschlechtlichen Fortpflanzung von Vaucheria, einer zu den Siphoneen gehörigen Gattung unserer Süßwasseralgen, mit welcher Klebs (92) mit großer Sicherheit experimentiert hat. Während diese Algen in strömendem Wasser niemals Geschlechtsorgane bilden, werden sie durch Hemmung des Wachstums, wie dieselbe durch Verbringen der Algen in reines Wasser eintritt, sofort dazu veranlaßt. An Stelle des Sauerstoffes für die Sporenbildung der Bakterien ist bei Vaucheria das Licht als spezifische Bedingung für das Zustandekommen der Geschlechtsorgane erforderlich.

Tabellen.

1. Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Auskeimung und Sporenbildung

Nährsubstrat: 1 Proz. Liebig's Fleischextraktlösung + 1 Proz. Pepton.

Temperatur C.	Bacillus anthracis		Bacillus subtilis		Bacillus tumescens	
	Zeit der		Zeit der		Zeit der	
	Auskeimung	Sporenbildung	Auskeimung	Sporenbildung	Auskeimung	Sporenbildung
8°	—	—	Tage 8	—	—	—
10°	—	—	6	Tage 14	Tage 8	—
12°	Tage 6	—	5	14	8	Tage 14
14°	4	10	4	12	5	8—10
15°	4	8	3	8	4	8
20°	Stunden 24	Stunden 96	Stunden 26	Stunden 96	Stunden 22	Stunden 90
25°	24	84	20	80	15	72
30°	12	62	10	55	8	48
34°	10	48	7	45	5	45
37°	8—10	40	5	36—40	5	40
40°	8	36—40	5	36	8	40
42°	12	40	5	34	8	48
45°	15	—	5—7	30—34	12	—
47°	—	—	7	36	—	—
50°	—	—	10	—	—	—

2. Einfluß verschiedener Nährsubstrate.

a) Bacillus anthracis:

Nährsubstrat	Entwickelung	Dauer bis zur Sporenbildung	Maße (μ)	
			Länge	Breite
1) 1 Proz. Asparagin + Nährsalze	—	—	—	—
2) 1 Proz. weinsaueres Ammoniak	—	—	—	—

Nährsubstrat	Entwickelung	Dauer bis zur Sporenbildung	Maße (μ)	
			Länge	Breite
		Stunden		
3) Pflaumendekokt	sehr spärlich, Involutionsformen	75	Fäden	0,8—1,0
4) Heuauszug	sehr spärlich	70—72	„	1,2
5) 1 Proz. Liebig's Fleischextrakt	mittelmäßig bis gut	60	„	1,2
6) 1 Proz. Pepton + Nährsalze	sehr reichlich	54	„	1,5
7) 1 Proz. Lieb. Fleischextr. + 1 Proz. Agar	sehr reichlich	54	„	1,2
8) Kartoffeln	sehr reichlich mit kürzeren Gliedern	45	7,0—9,0 Fäden	1,5
	b) Bacillus subtilis:			
1) 1 Proz. Asparagin + Nährsalze	gering, ohne Hautbildung, erhöhtes Schwärmstadium	80	2,5—5,0	0.6
2) 1 Proz. weinsaueres Ammoniak	gering	75—80	2,5—9,0	0,6
3) Pflaumendekokt	spärlich, kolbige Anschwellungen	65	2,2—9,0	0,7
4) Heuauszug	reichlich, grauweifse gefaltete Haut	58	7,2—9,0 —40,0	1,0
5) 1 Proz. Liebig's Fleischextrakt	reichlich	58—60	7,0—24,0	0,8
6) 1 Proz. Pepton + Nährsalze	sehr reichlich, geringe Beweglichkeit	54	7,2—9,0	1,2
7) 1 Proz. Lieb. Fleischextr. + 1 Proz. Agar	sehr reichlich, trockene Haut	50	5,2	0,8—1,0
8) Kartoffeln	sehr reichlich, schleimig-schmierige Haut	48	3,7—7,0	1,0
	c) Bacillus tumescens:			
1) 1 Proz. Asparagin + Nährsalze	—	—	—	—
2) 1 Proz. weinsaueres Ammoniak	—	—	—	—
3) Pflaumendekokt	sehr gering, Sporenbildung selten	75	1,8—3,6	1,2—1,4
4) Heuauszug	sehr gering, Sporenbildung selten	75	1,8—5,2	1,2—1,5
5) 1 Proz. Liebig's Fleischextrakt	spärlich, weißer Randsaum	65	2,0—5,4	1,5
6) 1 Proz. Pepton + Nährsalze	sehr reichlich, Hautbildung	48	5,0—7,0	1,8—2,0
7) 1 Proz. Lieb. Fleischextr. + 1 Proz. Agar	sehr reichlich, weiße gelappte Haut	48—50	3,6—9,0	1,5—1,8
8) Kartoffeln	sehr reichlich, schmierig weißer Belag	48	3,6—10,0	2.0

3. Einfluß organischer Nährstoffe.

a) Asparagin.

Proz.	Bacillus anthracis			Bacillus subtilis			Bacillus tumescens		
	Dauer bis zur Sporenbildung	Maße (μ) Länge	Breite	Dauer bis zur Sporenbildung	Maße (μ) Länge	Breite	Dauer bis zur Sporenbildung	Maße (μ) Länge	Breite
				Stunden					
5,0	—	—	—	80	2,5—5,0	0,6	—	—	—
10,0	—	—	—	80	2,5—5,0	0,6	—	—	—

b) Weinsaueres Ammoniak.

5,0	—	—	—	75	2,5—9,0	0,6	—	—	—
10,0	—	—	—	80	2,5—9,0	0,6	—	—	—
17,0	—	—	—	80	2,5—9,0	0,6	—	—	—

c) Pepton.

	Stunden			Stunden			Stunden		
5,0	50	7,0—12,0	1,5	50	7,2—9,0	1,2	48	5,0—7,0	1,8—2,0
10,0	48	„	1,5	45—48	5,0—9,0	1,2	45	5,0—7,0	2,0
20,0	45	„	1,5—1,8	40	3,6—7,2	1,5—1,2	36—40	2,5—6,0	2,0—2,5

d) Maltose.

1,0	54	Fäden	1,5	56	12,0-45,0	1,0	58	7,0—25,0	1,2—1,5
7,0	—	—	—	62	7,0—24,0	1,0	64	4,5—9,0	1,2
10,0	—	—	—	65	5,2—12,0	0,8—1,0	—	—	—

e) Traubenzucker.

1,0	62	Fäden	1,2	62	Fäden	1,0	58	3,6—9,0 —40,0	1,5—1,8
5,0	66	„	1,2	68	9,0—36,0	0,8—1,0	65	5,2—21,0	1,5
10,0	70	„	1,0	74	5,4—12,0	1,0	70	2,5—7,0	1,8
15,0	74	„	1,0	65	3,6—7,2	0,8—1,0	68	2,5—5,2	1,5

f) Glycerin.

	Stunden			Stunden					
1,0	56	Fäden	1,5	58	9,0—36,0	1,0	54	5,0—24,0	1,8
5,0	64	„	1,2	60	9,0—36,0	1,0—1,2	58	5,0—9,0 —24,0	1,5
10,0	—	—	—	62	5,0—18,0	1,0	60	3,2—7,5	1,5
12,0	—	—	—	62	3,6—7,0	0,8—1,0	—	—	—

4. Einfluß anorganischer Salze.

a) Kalium phosphoricum.

0,05	60	Fäden	1,2	56	7,0—9,0	0,8	54	7,0—9,0	1,5
0,1	54	„	1,5	54	7,0—9,0	1,2	48	5,0—7,0	1,8
0,5	62	„	1,2	54	7,0—9,0	1,0	50	5,0—9,0	1,8
1,0	62	„	1,2	60	3,5—6,0	1,0	60	2,5—5,4	1,5
5,0	—	—	—	72	2,4—5,0	0,8	68	2,5—5,0	1,2

b) Kalium nitricum.

1,0	60	Fäden	1,2	58	5,0—30,0	1,2	70	3,6—9,0	1,8
3,0	70	„	1,0	60	—50,0	1,0	75	2,5—7,2	1,5
5,0	85	„ 15,0-40,0	1,0	65	5,0—24,0	1,0	96	1,8—5,4	1,5
7,0	85	Fäden	1,0	72	3,6—12,0	1,0	96	1,8—3,6	1,2—1,5
10,0	—	—	—	96	3,5—5,4	0,8	selten	1,8—2,4	1,2
12,0	—	—	—	96	3,5—5,4	0,8	—	—	—

c) Magnesium sulfuricum:

Proz.	Bacillus anthracis			Bacillus subtilis			Bacillus tumescens		
	Dauer bis zur Sporenbildung	Maße (μ) Länge	Breite	Dauer bis zur Sporenbildung	Maße (μ) Länge	Breite	Dauer bis zur Sporenbildung	Maße (μ) Länge	Breite
	Stunden			Stunden			Stunden		
0,05	54	Fäden	1,5	54	7,2—9,0	1,2	48	5,0—7,0	1,8
0,1	60	„	1,2	56	7,2—9,0	1,2	54	5,0—7,0	1,5
1,0	75	„ 7,0—30,0	1,0	62	3,6—7,0	1,0	65	3,5—6,0	1,5
2,0	96	„	1,0	80	2,5—5,4	0,8	96	1,8—4,0	1,2
5,0	—	—	—	96	2,5—5,0	0,8	selten	1,8—3,6	1;2
				d) Natrium chloratum:					
1,0	58	Fäden	1,0	54	5,0—12,0	1,0	60	—9,0	1,5
2,0	64	„ 7,0—40,0 Fäden	1,0	60	3,6—9,0	0,8	68	2,5—7,5	1,5
4,0	84	7,0—15,0	0,8—1,0	74	2,5—5,4	0,8	84	1,8—3,6	1,2
7,0	—	—	—	96	1,8—3,6	0,7	96	1,8—3,6	1,2
				5. Einfluß der Reaktion.					
				a) Natrium carbonicum:					
0,1	58	Fäden	1,5	58	—7,0	1,0	54	3,6—9,0	1,5
1,0	54	„ —30,0 Fäden	1,5	58	7,2—12,0	1,0	54	5,0—9,0	1,5
2,0	60	7,0—12,0 Fäden	1,2	54	7,0—20,0	1,0	54	9,0—20,0	1,2
3,0	75	—20,0	1,0—1,2	60	5,0—9,0	0,8	60	3,5—7,0	1,5
5,0	—	—	—	75	2,5—6,0	0,8	84	1,8—3,0	1,2
				c) Acidum tartaricum:					
0,1	65	Fäden	1,2	58	5,2—12,0	0,8—1,0	65	3,6—5,5	1,5
0.3	96	„	1,0	60	5,0—7,0	0,8	70	3,6—4,5	1,2
0.5	—	—	—	75	3,2—6,0	0,8	80	1,8—3,0	1,2
1,0	—	—	—	96	2,4—4,5	0,6	selten	1,8—2,4	Involutionsformen
				6. Saurer Liebig's Fleischextrakt.					
5.0	65	Fäden	1,2	56	7.0—29,0	1,0	65	2,4—6,0	1,5
7,0	96	„	1,0—1,2	58	5,0—9,0	0,8	68	3,5—5,5	1,2
10,0	selten, Involutionsformen	„	1,0	75	3,6—6,0	0,8	96	2,4—4,0	1,2
15,0	—	—	—	82	3,2—5,0	0,7	96	1,8—3,2	1,5
18,0	—	—	—	96	2,4—4.0	0,6	—	—	—
				7. Einfluß verschiedener Konzentrationen des Liebig's Fleischextrakt.					
0.5	75	Fäden	1,2	70	5,4—24,0	0,8	70	1,8—2,4	1,2
5,0	58	„	1,5—1.2	60	—50,0	1,0	68	2,5—9,0	1,5
8,0	56	„	1,5	56	7,0—24,0	1,0	63	2,0—12,0	1,8
12,0	80	„	1,2	56	3,5—8,0	1 2	55	7,0—15,0	1,8
16,0	—	—	—	54	8,0—24 0	1,0	54	—30,0	2,0
23,0	—	—	—	50	—50	1,2	70—84	3,6—5,4	1,5
25,0	—	—	—	50	3,0—36,0	1,2	—	—	—
40,0	—	—	—	68	2,5—7,2	0,8	—	—	—
45,0	—	—	—	96	2,0—4,8	0,8	—	—	—

Litteratur.

86) Arloing, Influence de la lumière blanche et de ses rayons constituants sur le développment et les propriétés du Bacillus anthracis. (Arch. de Physiologie norm. et pathol. 1886.)

87) — —, Destruction des spores du bacillus anthracis par la lumière solaire. (La Semaine méd. 1887.)

84) de Bary, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien. 1884.

90) Baumgarten, Lehrbuch der pathologischen Mykologie. 1890.

89) Behring, Beiträge zur Aetiologie des Milzbrandes. (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. VI u. VII. 1889.)

88) Bitter, Kommt durch die Entwickelung von Bakterien im lebenden Körper eine Erschöpfung desselben an Bakteriennährstoffen zustande? (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. IV. 1888.)

85) Bollinger, Zur Aetiologie des Milzbrandes. (Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Morphologie u. Physiologie. München 1885.)

81) Brefeld, Bacillus subtilis Untersuchungen über Schimmelpilze. IV. 1881.

82) Buchner, Ueber die experimentelle Erzeugung des Milzbrandkontagiums aus den Heupilzen.

— —, Beiträge zur Morphologie der Spaltpilze.

— —, Kritisches und Experimentelles über die Frage der Konstanz der pathogenen Spaltpilze.

Naegeli, Untersuchungen über niedere Pilze. 1882.

90) — —, Ueber die Ursache der Sporenbildung des Milzbrandbacillus.

— —, Ueber den Einfluß höherer Konzentrationen des Nährmediums auf Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1890.)

76) Cohn, Untersuchungen über Bakterien. (Beitr. z. Biologie der Pflanzen. 1876.)

95) Fischer, A., Untersuchungen über Bakterien. (Pringsheim's Jahrbücher f. wissenschaftl. Botanik. 1895.)

86) Flügge, Die Mikroorganismen. 1886.

91) Fraenkel, Grundriß der Bakterienkunde. 1891.

85) de Freytag, Ueber die Einwirkung konzentrierter Kochsalzlösungen auf das Leben von Bakterien. (Arch. f. Hygiene. Bd. VI. 1885.)

80) Friedländer, Identität von Bacillus anthracis und subtilis. (Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1880.)

91) Hueppe, Methoden der Bakterienforschung. 1891.

90) Kitasato, Untersuchungen über die Sporenbildung des Milzbrandbacillus in verschiedenen Bodentiefen. (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. VIII. 1890.)

85) Kitt, Zur Aetiologie des Milzbrandes. (Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Morphologie u. Physiologie. München 1885.)

93) — —, Bakterienkunde und pathologische Mikroskopie. 1893.

88) Koch, A., Ueber Morphologie und Entwickelungsgeschichte einiger endosporer Bakterienformen. (Botan. Ztg. 1888.)

76) Koch, R., Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwickelungsgeschichte des Bacillus anthracis.

— —, Verfahren zur Untersuchung, zum Konservieren und Photographieren der Bakterien.

Cohn, Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 1876.

81) — —, Zur Aetiologie des Milzbrandes. (Mitteil. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt. 1881.)

92) Klebs, G., Zur Physiologie der Fortpflanzung von Vaucheria sessilis. (Verhandl. d. naturforsch. Gesellsch. zu Basel. Bd. XI. 1892.)

87) Lehmann, Ueber Sporenbildung bei Milzbrand. (Münch. med. Wochenschr. 1887.)

90) — —, Ueber einige Bedingungen der Sporenbildung beim Milzbrand. (Sitzungsber. d. physik. med. Gesellsch. zu Würzburg. 1890.)

88) Lewin, Zur Frage über die Sporenbildung beim Milzbrandbacillus. (Wratsch. 1887. — Ref. Centralbl. f. klin. Med. 1888.)

92) Momont, Action de la dessication de l'air et de la lumière sur la bacteridie charbonneuse filamenteuse. (Annal. de l'Instit. Pasteur. T. VI. 1892.)

90) Osborne, Die Sporenbildung des Milzbrandbacillus auf Nährböden von verschiedenem Gehalt an Nährstoffen. (Arch. f. Hygiene. Bd. XI. 1890.)

92) Phisalix, Etat asporogène héréditaire du Bacillus anthracis. (Le Bull. méd. 1892. — Ref. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1892.)
— —, Régéneration expérimentale de la propriété sporogène chez le Bacillus anthracis rendu asporogène. (La Semaine méd. 1892.)
84) Prazmowsky, Ueber die genetische Zusammengehörigkeit von Milzbrand und Heupilzen. (Biolog. Centralbl. 1884.)
95) Rodet, De la variabilité dans les microbes au point de vue morphologique et physiologique. Paris 1895.
90) Roux, Bactéridie charbonneuse asporogène. (Annal. de l'Instit. Pasteur. T. IV. 1890.)
86) Soyka, Bakteriologische Untersuchungen über den Einfluß des Bodens auf die Entwickelung pathogener Pilze. (Fortschr. d. Med. 1886.)
88) — — u. Bandler, Die Entwickelung von pathogenen Spaltpilzen unter dem Einfluß ihrer Zersetzungsprodukte. (Fortschr. d. Med. 1888.)
92) Schlütter, Das Wachstum der Bakterien auf saurem Nährboden. (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1892.)
84) Schrakamp, Zur Aetiologie des Milzbrandes. (Arch. f. Hygiene. 1884.)
91) Turrò, Contribucion ad estudio de la esporulation del Bacillus anthracis. (Gaceta medica catalena. 1891. — Ref. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. Bd. X. 1891.)
84) Winogradsky, Ueber die Wirkung äußerer Einflüsse auf die Entwickelung von Mycoderma vini. (Arbeiten d. St. Petersb. naturforsch. Gesellsch. Bd XIV. 1884. — Ref. Botan. Centralbl. Bd. XX. 1884.)
85) Zopf, Die Spaltpilze. 1885.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 1586

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.